



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 173 670**

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98966608.6**

⑧⑥ Fecha de presentación: **04.12.1998**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1 036 202**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2000**

⑤④ Título: **Procedimiento de identificación de ácidos nucleicos mediante espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz.**

③⑩ Prioridad: **05.12.1997 EP 97121471**

⑦③ Titular/es:
**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
14195 Berlin, DE**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.10.2002

⑦② Inventor/es: **Gut, Ivo Glynne;
Berlin, Kurt y
Lehrach, Hans**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.10.2002

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 173 670 T3

DESCRIPCION

Procedimiento de identificación de ácidos nucleicos mediante espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico, mediante sondas predeterminadas de distinta masa, usando la espectrometría de masas láser de desorción/ ionización asistida por matriz. El procedimiento de la presente invención tiene la ventaja de poder caracterizar simultáneamente un sinnúmero de moléculas desconocidas de ácidos nucleicos mediante una serie de sondas distintas. Asimismo, esta invención se refiere a un
10 equipo que incluye las sondas y/o un soporte de muestras, eventualmente con moléculas de ácido nucleico fijadas al mismo.

La caracterización de ácidos nucleicos es muy costosa y cara. Un ADN desconocido puede caracterizarse mediante su secuenciación. Este es el modo más preciso de analizar ADN. No obstante, la
15 secuenciación de ADN es muy costosa y solo es necesaria si interesa la secuencia completa. En un turno de trabajo solo pueden secuenciarse fragmentos muy cortos de ADN (< 1000 bases nucleicas). Si hay que analizar a gran escala fragmentos de ADN de longitud superior a dichas 1000 bases nucleicas, es necesario subdividir el ADN, lo cual encarece el método.

20 No obstante, pueden hacerse muchas afirmaciones con un menor grado de disociación. Sin embargo, los procedimientos actualmente descritos tienen el inconveniente de que en determinadas circunstancias hay que usar radioactividad y solo puede utilizarse una sonda en cada análisis. Un procedimiento como este, del estado técnico actual, contiene, por ejemplo, información parcial sobre series de distintos ADN
25 objeto de análisis. Se puede inmovilizar una serie con varios miles de ADN-objeto sobre una fase sólida y, a continuación, analizar conjuntamente mediante una sonda (ácido nucleico con secuencia complementaria) si todos los ADN-objeto tienen una determinada secuencia.^{1,2} Mediante una hibridación de ambos ácidos nucleicos puede identificarse en el ADN-objeto una coincidencia con la sonda. Las sondas pueden estar formadas por cualquier secuencia de ácidos nucleicos de diferente longitud. Existen varios procedimientos para seleccionar bibliotecas óptimas de secuencias de sondas, que se solapan mínimamente entre sí.^{3,4} Las
30 secuencias de las sondas también se pueden combinar ex profeso para descubrir determinadas secuencias del ADN-objeto. Esta tecnología comienza a emplearse en la "oligoimpresión dactilar". Una biblioteca de ADN-objeto se explora con sondas cortas de ácidos nucleicos. En este caso la mayoría de las sondas tienen una longitud de solo 8-12 bases. En cada caso se hibrida sin interrupción una sonda a una biblioteca de ADN-objeto, inmovilizada sobre una membrana de nylon. La sonda está marcada radiactivamente
35 y la hibridación se aprecia localizando la radioactividad. Para explorar una serie inmovilizada de ADNs también se han empleado sondas marcadas con fluorescencia.⁵ Se usa un procedimiento análogo para secuenciaciones múltiples de ADN.^{6,7} Para clonar secuencias-objeto se usan diversos sistemas vectores. Se reserva un clon de cada vector de clonación, se efectúa la reacción de secuenciación, se deshacen los fragmentos sobre un gel y el gel se extiende sobre una membrana de nylon. A continuación se hibridan
40 al ADN inmovilizado las distintas secuencias del sistema de clonación, con lo cual se obtiene la secuencia perteneciente al respectivo sistema de clonación. Aquí, la exploración del sistema de clonación también puede realizarse mediante una sonda detectable por espectrometría de masas.⁸

Como sondas cabe considerar cualquier molécula que pueda interactuar de modo secuencialmente
45 específico con un ADN-objeto. Las más corrientes son los oligodesoxirribonucleótidos. No obstante, para este fin también sirve cualquier modificación de ácidos nucleicos, p.ej. los ácidos nucleicos péptidos (PNA),^{9,10} los fosforotioato-oligonucleótidos o los metilfosfonato-oligonucleótidos. La especificidad de una sonda es muy fundamental. Los fosforotioato-oligonucleótidos no son especialmente preferidos, ya
50 que la alteración de su estructura por el átomo de azufre tiene una influencia negativa en las propiedades de hibridación. Ello puede ser debido a que los diastereoisómeros de los fosforotioato-oligonucleótidos no se sintetizan normalmente en forma pura. En el pasado existía un problema de pureza parecido con los metilfosfonato-oligonucleótidos, pero los diastereoisómeros de estos oligonucleótidos se sintetizan cada vez
55 más en forma pura. Una diferencia esencial entre los metilfosfonato-oligonucleótidos y los fosforotioato-oligonucleótidos es el esqueleto no cargado de los primeros, que hace la hibridación menos dependiente de las sales tampón y confiere globalmente mayor afinidad al haber poca repulsión. Los ácidos nucleicos péptidos también tienen un esqueleto no cargado, que difiere mucho químicamente de la estructura de fosfato de azúcar típica de los ácidos nucleicos. El esqueleto de un PNA presenta una secuencia amídica en lugar del esqueleto de fosfato de azúcar de los ADNs corrientes. Un PNA hibrida muy bien con secuencia complementaria de ADN. La temperatura de fusión de un híbrido PNA/ADN es superior a la del
60 correspondiente híbrido ADN/ADN y de nuevo, la hibridación depende relativamente poco de las sales tampón.

La espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI) es un método nuevo y muy eficaz para analizar biomoléculas.¹¹ Se incluye una molécula de analito en una matriz absorbente de luz. Con una breve pulsión láser se evapora la matriz y el analito sin fragmentar pasa a la fase gaseosa. Mediante choques con moléculas de la matriz se logra la ionización del analito. La aplicación de un voltaje acelera los iones en un "tubo de vuelo" libre de campos. Debido a sus distintas masas, los iones adquieren aceleraciones diferentes. Los iones más pequeños alcanzan el detector antes que los más grandes. El tiempo de vuelo se convierte mediante un cálculo en la masa de los iones. Las innovaciones técnicas de hardware han mejorado mucho el método. Digna de mención es la extracción retardada (DE).¹² Para la DE, el voltaje de aceleración se conecta con retraso respecto a la pulsión del láser, logrando así una mejor resolución de las señales al disminuir el número de choques. El proceso MALDI es excelente para analizar péptidos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos es más difícil.¹³ Para los ácidos nucleicos la sensibilidad es 100 veces peor que para los péptidos y disminuye proporcionalmente con el aumento de tamaño de los fragmentos. La causa es que para ionizar los péptidos y las proteínas solo hay que captar un único protón. En los ácidos nucleicos, como tienen un esqueleto de carga negativa múltiple, el proceso de ionización por la matriz es mucho menos eficaz. En la MALDI juega un papel eminentemente importante la elección de la matriz. Para la desorción de péptidos se han encontrado algunas matrices muy efectivas, que producen una cristalización muy fina. Entretanto se han descubierto algunas matrices satisfactorias para ADN, aunque no han contribuido a reducir la diferencia de sensibilidad. Esta puede reducirse modificando químicamente el ADN para que se parezca a un péptido. Los ácidos fósforotioato-nucleicos, en que los fosfatos habituales del esqueleto están sustituidos por tiofosfatos, pueden transformarse químicamente por alquilación sencilla en un ADN de carga neutra.¹⁴ El acoplamiento de un "marcador cargado" a este ADN modificado aumenta la sensibilidad al mismo nivel encontrado para los péptidos.^{15,16} Esta modificación también ha abierto la posibilidad de usar matrices similares a las utilizadas en la desorción de péptidos. Otra ventaja de introducir marcadores cargados es la mayor estabilidad del análisis frente a las impurezas, que dificultan mucho la identificación de los sustratos no modificados. Con la MALDI se han investigado PNAs y metilfosfonato-oligonucleótidos, y es factible analizarlos de este modo.^{17,18,19}

T.J. Griffin y otros (1997) *Nature Biotechnol.* 15, 1368-1372, revelan un procedimiento para identificar sitios polimórficos en ADN mediante los siguientes pasos: (i) inmovilización de ADN biotinizado de cadena doble sobre un soporte recubierto de estreptavidina, (ii) desnaturalización de los ADN inmovilizados, (iii) hibridación de dos sondas de PNA con el ADN-objeto, de modo que una sonda presenta la secuencia nativa de nucleótidos del alelo y la otra un desajuste de una base (ambas sondas van dotadas de varios marcadores máscicos), (iv) eliminación del material no hibridado, (v) análisis del híbrido PNA-ADN inmovilizado mediante MALDI-TOF, registrando los espectros de masas específicos de las muestras.

Las síntesis combinatorias,²⁰ es decir la preparación de bibliotecas de sustancias partiendo de una mezcla de etapas previas, se realizan tanto sobre fase sólida como en fase líquida. Ante todo, la síntesis combinatoria sobre fase sólida se ha establecido muy pronto, porque en este caso resulta especialmente fácil separar los productos secundarios. En una etapa de lavado solo se retienen los compuestos objeto unidos al soporte y al final de la síntesis se aíslan provocando la división de un ligador. Esta técnica permite mediante una vía fácil la síntesis simultánea de muchos compuestos distintos sobre una fase sólida y, por lo tanto, obtener bibliotecas de sustancias químicamente "puras".^{21,22,23} Por consiguiente, las clases de compuestos que se sintetizan sobre una fase sólida, pero del modo convencional, es decir no combinatorio, son muy fáciles de obtener mediante la química combinatoria y por eso también se usan ampliamente. Esto se aplica sobre todo a las bibliotecas de péptidos, ácidos nucleicos y PNA.

La síntesis de los péptidos se efectúa uniendo el primer aminoácido con N protegido (p.ej. Boc) al soporte, eliminando luego la protección y reaccionando el segundo aminoácido con el grupo NH₂ liberado del primero. Los grupos amino sin reaccionar se vuelven a proteger para evitar que sigan reaccionando en el siguiente ciclo de la síntesis. Se quita el grupo protector de la función amino del segundo aminoácido para que pueda acoplarse el siguiente bloque. Para sintetizar bibliotecas de péptidos se usa una mezcla de aminoácidos en una o varias etapas. La síntesis de PNA y de bibliotecas de PNA se realiza de manera análoga.

Las bibliotecas de ácidos nucleicos se obtienen principalmente mediante la síntesis sobre fase sólida partiendo de mezclas de diversos fósforoamidito-nucleósidos, la cual puede efectuarse sobre sintetizadores de ADN comercialmente disponibles, sin variar los protocolos de síntesis. Además se han publicado varios trabajos sobre la síntesis combinatoria de bibliotecas de PNA.^{24,25} Estos trabajos tratan de la formación de secuencias combinatorias, es decir de la síntesis de PNAs en los cuales se sustituyen bases específicas de la secuencia por bases degeneradas, obteniendo así una varianza aleatoria de secuencias. También se ha descrito varias veces el uso de métodos de espectrometría de masas para analizar biblio-

tecas combinatorias.^{26,27,28,29}

Existen diversos métodos para inmovilizar ADN. El método más conocido consiste en fijar un ADN funcionalizado con biotina sobre una superficie recubierta con estreptavidina.³⁰ La fuerza de unión de este sistema corresponde, sin serlo, a un enlace químico covalente. Para conseguir el enlace covalente de un ADN-objeto a una superficie químicamente preparada, es preciso que el ADN-objeto tenga la correspondiente funcionalidad. El ADN mismo no posee ninguna apropiada para ello. Hay diversas variantes para introducir una funcionalidad adecuada en un ADN-objeto: dos funcionalidades fáciles de manejar son las aminas y tioles alifáticos primarios. Estas aminas reaccionan cuantitativamente con N-hidroxisuccinimidoésteres. En condiciones adecuadas los tioles reaccionan cuantitativamente con yoduros de alquilo. La dificultad consiste en introducir una funcionalidad de este tipo en un ADN. La variante más sencilla es la introducción mediante un cebador de una PCR. En las variantes comprobadas se emplea un cebador modificado en 5' (NH₂ y SH) y un ligador bifuncional.^{31,32,33}

Para la inmovilización sobre una superficie es de suma importancia, ante todo, su naturaleza. Los sistemas descritos hasta ahora son principalmente de silicio o metálicos (perlas magnéticas). Otro método de fijar un ADN-objeto se basa en el uso de una secuencia corta de reconocimiento (p.ej. 20 bases) en el ADN-objeto para hibridarlo a un oligonucleótido inmovilizado sobre una superficie.³⁴ Para la introducción de posiciones químicamente activadas en un ADN-objeto también se han descrito variantes enzimáticas.³⁵ En este caso se efectúa una funcionalización enzimática de NH₂ en 5'.

Tal como se ha descrito anteriormente, en el estado de la técnica se conoce una serie de procedimientos, orientados sobre todo al análisis exacto de los ácidos nucleicos. Estos procedimientos son generalmente muy onerosos y/o caros.

Por lo tanto el problema técnico motivo de la presente invención era proporcionar un método rápido, y eficiente en cuanto a costes, para identificar ácidos nucleicos-objeto.

Dicho problema técnico se resuelve facilitando las formas de ejecución caracterizadas en las reivindicaciones de la patente.

Así pues, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico, el cual comprende las siguientes etapas:

- (a) hibridación de moléculas de ácido nucleico con una serie de sondas de distintas secuencias de nucleobases, en que cada sonda posee una masa diferente de todas las demás;
- (b) separación de las sondas no hibridadas;
- (c) puesta en contacto de las sondas hibridadas con una matriz que favorece la desorción de las sondas por un rayo láser;
- (d) análisis de las sondas hibridadas y envueltas por la matriz, sobre un soporte de muestras formado por material conductor eléctrico, en un espectrómetro de masas, y
- (e) determinación de las moléculas de ácido nucleico que presentan la secuencia,

de modo que las posiciones de las sondas sobre el soporte de las muestras permiten una asignación a la molécula de ácido nucleico con la cual se hibridan.

El procedimiento de la presente invención combina ventajosamente la manera de analizar series de ácidos nucleicos objeto (oligoimpresión dactilar) con el análisis espectrométrico de masas de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos modificados. Para ello se emplea un gran número de diversas sondas, que permiten identificar una o varias secuencias de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico. Hasta la fecha no era factible una combinación de ambos métodos, porque la capacidad de distinguir las masas de las sondas no permitía ninguna conclusión clara sobre la secuencia, y la sensibilidad del análisis espectrométrico de masas para los ácidos nucleicos no se adaptaba a las cantidades de muestra de un experimento de oligoimpresión dactilar. La condición para poder identificar una determinada secuencia es emplear en el procedimiento sondas que permitan una hibridación con la secuencia-objeto. El análisis de la molécula de ácido nucleico tiene lugar a través de la hibridación con una de las sondas.

Para el especialista es evidente que una secuencia de nucleótidos objeto de análisis no siempre puede ser determinada de modo absoluto mediante procedimientos de hibridación, ya que en condiciones de hibridación rigurosas y a pesar de los llamados "desajustes" también puede hibridarse una sonda en

ciertas circunstancias (p.ej. a partir de una determinada longitud mínima de una sonda o en una o más posiciones del o de los desajuste(s) tolerables por la hibridación). Por lo tanto, con una sonda de cierta secuencia de nucleótidos, una secuencia complementaria en la molécula de ácido nucleico solo puede ser determinada con alguna aproximación en una parte de las formas de ejecución, pues junto a las secuencias exactamente complementarias, si las circunstancias lo permiten, también pueden determinarse otras que no lo son del todo. A este respecto, la secuencia de nucleótidos también incluye secuencias homólogas de nucleótidos que presentan preferentemente un grado de homología mayor del 90 % y con especial preferencia mayor del 95 %. Todas estas formas de ejecución precedentes están comprendidas en la presente invención.

Según la elección de las condiciones de hibridación, el procedimiento de la presente invención puede emplearse para identificar secuencias de nucleótidos específicas o grupos de secuencias de nucleótidos caracterizadas por una secuencia similar. Si p.ej. se escogen condiciones de hibridación rigurosas, las sondas empleadas solo podrán hibridarse a las secuencias de nucleótidos que sean exactamente complementarias de sus secuencias de nucleobases. Si por el contrario, las condiciones de hibridación elegidas no son rigurosas, con las sondas empleadas podrán identificarse todas las secuencias de nucleótidos cuya divergencia respecto a las nucleobases de la sondas sea tal, que aún permita la hibridación en las condiciones elegidas. De este modo, el procedimiento de la presente invención también puede usarse para identificar homólogos, variantes o alelos de una determinada secuencia. El especialista ya sabe qué se entiende como condiciones de hibridación rigurosas o no rigurosas; ver p.ej. Sambrook y otros, "Clonación molecular, manual de laboratorio" CSH Press, Cold Spring Harbor, 2ª ed. 1989, Hames y Higgins (Hrsg.) "Hibridación de ácido nucleico, estudio práctico", IRL Press, Oxford 1985. Condiciones de hibridación rigurosas son, por ejemplo, hibridación en $6 \times \text{SSC}$, $5 \times$ reactivo de Denhardt, 0,5 % SDS y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ADN desnaturalizado a 65°C y lavado en $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS a 65°C. Las condiciones de hibridación no rigurosas se distinguen de las anteriores en que, por ejemplo, la hibridación y/o el lavado se realizan a una temperatura menor, p.ej. a 50°C o 55°C y la cantidad de SSC se aumenta p.ej. a $1 \times$ o $2 \times \text{SSC}$.

El procedimiento de la presente invención también permite identificar varias secuencias distintas en un ADN-objeto, en que las distintas secuencias sean complementarias de diferentes sondas. En el caso más favorable, p.ej. al usar sondas con secuencias solapadas, se puede identificar o averiguar toda la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico objeto.

Con el procedimiento de la presente invención se puede determinar primero si hay una muestra aplicada al soporte que tenga una secuencia hibridable con una sonda en las condiciones elegidas. En caso positivo se puede seguir analizando y caracterizando la muestra de ácido nucleico. Como en el procedimiento de la presente invención solo debe utilizarse normalmente una fracción de una muestra para el análisis según la presente invención, el ácido nucleico no empleado se puede seguir investigando por los métodos estándar, p.ej. mediante secuenciación.

El procedimiento de la presente invención también puede realizarse varias veces, de modo paralelo o sucesivo, variando las condiciones de hibridación. Así, por ejemplo, en una serie de ADNs-objeto puede comprobarse primero cuántos y qué ADNs-objeto muestran un determinado grado de homología, antes de buscar secuencias específicas.

La sonda hibridada en determinada posición del soporte de muestras se asigna preferentemente a la muestra inmovilizada mediante un sistema informático que, sobre una posición del soporte de muestras, asigna el correspondiente espectro registrado a un ADN-objeto fijado en la misma posición. Preferentemente, los ácidos nucleicos objeto se fijan sobre la superficie o el soporte proteico siguiendo un cierto orden.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el soporte de muestras está formado por un material eléctricamente conductor, que también incluye la superficie del soporte de las muestras, sobre la cual se colocan las sondas hibridadas y envueltas por la matriz. El material de la superficie puede ser diferente al del soporte de las muestras.

La superficie, en la cual las sondas para la espectrometría de masas deben estar directa o indirectamente inmovilizadas, debe estar acondicionada para poder funcionar como un soporte de muestras de un espectrómetro de masas (figura 2). Esto significa que debe estar formada por un material eléctricamente conductor, ya que, para conseguir una aceleración estable de las moléculas ionizadas de la sonda, hay que aplicar una tensión definida. En una superficie no conductora se formarían cargas electrostáticas, con lo cual se observaría un desplazamiento de masas debido a la perturbación del voltaje y resultaría imposible asignar las masas.

ES 2 173 670 T3

A continuación se describen formas de ejecución preferidas de la presente invención, que también pueden tomarse de los ejemplos.

- 5 En una forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, las moléculas de ácido nucleico se transfieren a la superficie de un soporte, antes o después de la etapa (a). Como soporte son apropiadas p.ej. las "perlas magnéticas" y las perlas de plástico o de vidrio, funcionalizadas por ejemplo con estreptavidina o con grupos amino, SH o epoxi.
- 10 En una forma de ejecución especialmente preferida, la superficie del soporte es del mismo material eléctricamente conductor que conforma el soporte de las muestras. Esta forma de ejecución permite una realización relativamente sencilla del procedimiento, porque, una vez efectuada la hibridación, ya no es necesario transferir las moléculas de ácido nucleico al soporte de las muestras.
- 15 En otra forma de ejecución especialmente preferida del procedimiento de la presente invención, el soporte, que lleva incorporadas a su superficie las moléculas de ácido nucleico con las sondas hibridadas, se aplica antes de la etapa (c) sobre el soporte de muestras formado por material eléctricamente conductor. La fijación puede lograrse p.ej. mediante la propia matriz o añadiendo nitrocelulosa a la matriz.
- 20 En una forma de ejecución también especialmente preferida, las sondas hibridadas se desprenden de las moléculas de ácido nucleico antes, después o por el contacto con la matriz en la etapa (c), y se aplican sobre el soporte de muestras formado por material eléctricamente conductor. En esta forma de ejecución se desnaturalizan los complejos de moléculas de ácido nucleico y sondas hibridadas, aplicando solo las sondas al soporte de muestras. La desnaturalización puede efectuarse por los métodos conocidos, como
- 25 p.ej. la de tipo alcalino o térmico, o también mediante la solución ácida de matriz.

En otra forma de ejecución preferida, el soporte de las muestras posee una superficie metálica, recubierta de vidrio o modificada químicamente, que permite fijar el ADN-objeto.

- 30 En otra forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, la inmovilización de las moléculas de ácido nucleico en la superficie del soporte de muestras tiene lugar a través de una función NH_2 , epoxi o SH, recubriendo la superficie del soporte de muestras con un silicato o silano, mediante una interacción proteína-substrato, proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, o mediante una interacción de dos componentes hidrófobos.
- 35 Si p.ej. el soporte de muestras se recubre de oro, puede tener lugar un acoplamiento del ADN-objeto mediante las funciones SH o NH_2 introducidas durante la preparación biomolecular del ADN-objeto. También cabe la posibilidad inversa de fijar ADN convenientemente modificado a las partículas de oro funcionalizadas. La firma Nanoprobe Inc., Stony Brook, NY, ofrece comercialmente, por ejemplo, nanopartículas de oro combinadas con estreptavidina o con funciones amino. Como ya se ha dicho, otra
- 40 posibilidad consiste en recubrir de vidrio la superficie metálica del soporte de muestras. A continuación, mediante una funcionalización amino se puede conseguir un acoplamiento del ADN-objeto, unido por una grupo SH a un ligador bifuncional (p.ej. SIAB, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA), a la superficie de vidrio. Otra variante es el recubrimiento directo de la superficie metálica con trimetoxi-3-aminopropilsilano.
- 45 Luego, como arriba, se puede acoplar un ADN-objeto al grupo amino mediante un ligador bifuncional.

- En una forma de ejecución especialmente preferida, la interacción substrato-proteína consiste en un enlace biotina-estreptavidina o anticuerpo-antígeno. Los soportes de muestras MALDI suelen ser de metal (p.ej. de hierro), al que sin más modificación pueden inmovilizarse proteínas o moléculas de ADN.
- 50 Una posibilidad de inmovilización es el recubrimiento de la superficie de hierro con oro, porque permite la unión de p.ej. funciones SH. Luego para el acoplamiento pueden utilizarse ligadores bifuncionales, que poseen un grupo SH y otra función, adaptados a la funcionalización del ADN-objeto. Si, p.ej., el ADN-objeto está bifuncionalizado, el ligador debería acoplarse con estreptavidina. Si el ADN-objeto está funcionalizado con NH_2 , el ligador puede ir provisto entonces de un grupo N-hidroxisuccinimidiléster.

- 55 En otra forma de ejecución especialmente preferida, la interacción proteína-ácido nucleico es un enlace del ácido nucleico a Gen32, una proteína que fija de modo secuencialmente específico ADN de cadena única.

- 60 En otra forma de ejecución especialmente preferida de la presente invención, las sondas empleadas son ácidos nucleicos provistos de un marcador másico. Según esta forma de ejecución las sondas pueden llevar varios marcadores, localizados en diferentes posiciones, p.ej. en el extremo 5' y 3'. Por combinación

de la cantidad y localización de los marcadores másicos, eventualmente junto con marcadores cargados, puede incrementarse claramente la versatilidad y sensibilidad del procedimiento la presente invención.

En una forma de ejecución especialmente preferida, los marcadores másicos son al mismo tiempo marcadores cargados, mientras que en otra forma de ejecución especialmente preferida, los ácidos nucleicos van provistos de un marcador cargado adicional.

La introducción de marcadores cargados puede realizarse según el método de Gut y otros.^{15,16} Un sustrato aminofuncionalizado (1 mM) se mezcla en un tampón de trimetilamina/CO₂ (pH = 8,5, 200 mM), sobre hielo a 0°C, con 1 % de ω -trimetil-amoniohexanoato de N-hidroxi-succinimidilo (CT). Al cabo de 30 minutos, el tampón volátil y el disolvente se destilan al vacío. El sustrato aminofuncionalizado puede ser p.ej. una biblioteca de sondas de distintas masas, preparada combinatoriamente. Variando la longitud y la funcionalización del CT, las masas de la biblioteca-sustrato pueden modificarse en una cuantía definida (fig. 3). Como en la síntesis combinatoria, se prepara p.ej. una biblioteca de 64 sondas de distintas masas (fig. 4), abarcando un intervalo de masa de 200 Da, los marcadores másicos/cargados incrementan respectivamente las masas en unidades de 200 Da, es decir, la primera síntesis combinatoria se prepara con el marcador másico más pequeño posible, la segunda con un marcador másico/cargado 200 Da más pesado, la tercera con un marcador másico/cargado otros 200 Da más pesado, y así sucesivamente. Teóricamente el intervalo puede ampliarse a discreción, siempre que el espectrómetro de masas usado sea capaz de resolver la diferencia entre masas vecinas y que la síntesis parezca practicable. Para sondas con 10 nucleobases se obtiene una masa básica de 2600-2800 Da. Con los espectrómetros de masas actualmente disponibles, el intervalo de masas utilizable con suficiente exactitud es inferior a 4000 Da. Con ello pueden usarse siete conjuntos de 64 sondas (en total 448 sondas). En las figuras 5 y 6 se representan unos resultados obtenidos con esta forma de ejecución.

En un sintetizador automático, la síntesis de péptidos transcurre desde el extremo terminado en C hasta el extremo terminado en N, la síntesis de ácidos nucleicos desde el extremo 3' hasta el 5'. Cabe la posibilidad de unir un grupo amino primario a uno o ambos extremos, a fin de lograr luego la modificación de las masas mediante una o dos funcionalizaciones. Como alternativa, la modificación de las masas de una biblioteca de sondas combinatoriamente preparadas también se puede conseguir introduciendo algunos eslabones de masa definida (p.ej. aminoácidos en una síntesis combinatoria de PNAs) antes de agregar los eslabones combinatorios. El primer sistema combinatorio empieza directamente en el soporte. Para el segundo sistema combinatorio, primero se acoplan p.ej. dos valinas. La valina tiene una masa de 99 Da. Con dos valinas se consigue incrementar la masa del segundo sistema combinatorio en 198 Da respecto al primero. En la tercera síntesis combinatoria, primero se acoplan cuatro valinas, con lo cual la masa de este conjunto es 396 Da mayor. En el método arriba descrito, todavía puede agregarse posteriormente un marcador cargado, siempre necesario, al extremo terminado en N. Otra posibilidad consiste en acoplar primero los marcadores cargados a la fase sólida y, a continuación, proseguir con la síntesis combinatoria.

Otra variante consiste en incorporar simultáneamente varias cargas fijas de la misma polaridad. Así se puede limitar el intervalo de detección. En un espectrómetro de masas, una molécula con dos cargas se contempla por la correspondiente mitad de la masa, lo cual puede ser una ventaja cuando la resolución del espectrómetro de masas disminuye mucho a masas superiores. Arriba se describe cómo agregar cargas positivas fijas a una sonda. Las cargas negativas fijas pueden aportar ventajas similares. Las cargas positivas y negativas pueden prepararse por métodos análogos.

Para la localización, cantidad y combinación de los marcadores cargados son válidas las correspondientes ejecuciones realizadas en relación con los marcadores másicos. Así, con marcadores cargados en los extremos 5' o 3' de las sondas de ácido nucleico puede mejorarse la sensibilidad del análisis. Esto es válido, especialmente, cuando además se consigue neutralizar la carga mediante la introducción de grupos alquilfosfonato en posiciones no aleatorizadas (véase abajo). Con el marcado másico, unido forzosamente a los marcadores cargados, se facilita además el análisis de los fragmentos resultantes de la división en los grupos fósforotioato. También se pueden emplear fósforoselenoatos para conseguir una división preferente en determinadas posiciones.

En otra forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, las sondas son moléculas de ácido nucleico modificadas.

Según una forma de ejecución especialmente preferida, en el caso de dichas moléculas de ácido nucleico modificadas se trata de PNAs, ácidos alquilfósforotioato-nucleicos o ácidos alquilfosfonato-nucleicos.

En otra forma de ejecución preferida, las sondas para el procedimiento de la presente invención se preparan por síntesis combinatoria en fase sólida, que se realiza p.ej. mediante la habitual síntesis en fase sólida Boc, aplicada también comercialmente a la síntesis de sustancias puras de PNA. En este caso se introducen las cuatro (o más de una) bases adenina, guanina, citosina y timina dentro de una secuencia ya establecida del PNA que constituye las sondas. Esto tiene lugar utilizando no solo uno, sino varios eslabones sintéticos en una etapa de la síntesis en fase sólida. Mediante variaciones en algunas de tales posiciones se forma una biblioteca de PNA. Como complemento a la síntesis de PNA se puede agregar un marcador cargado al grupo amino terminal libre. Así se mejora el campo dinámico del análisis MALDI de PNA.

Por lo tanto, según una forma de ejecución especialmente preferida, los distintos eslabones de bases en la síntesis de fase sólida se marcan de tal modo, que sus masas o las masas de las sondas sintetizadas partiendo de ellos sean distinguibles en el espectrómetro de masas. Este marcado se efectúa introduciendo en el esqueleto una modificación másica distinta en correspondencia con la base (figura 7). De esta manera, las sondas sintéticas adquieren masas específicas para sus secuencias. Luego, con la unión de las sondas a un ADN-objeto inmovilizado sobre la placa MALDI, los datos de masas accesibles por el ensayo MALDI permiten extraer unas conclusiones claras sobre las secuencias de las sondas de PNA respectivamente hibridadas.

En otra forma de ejecución especialmente preferida del procedimiento de la presente invención, las bases se marcan con un grupo metilo, etilo, propilo, con un grupo alquilo ramificado o lineal, con un grupo alquilo, alcoxilquilo, alquilalilo, arilalquilo, alcoxilalilo o ariloxialquilo ramificado o lineal sustituido con halógeno, o con alguna de sus variantes con deuterio u otros isótopos. Dado que al utilizar eslabones sin bases modificadas, la masa molecular facilita igualmente conclusiones sobre la composición de las bases, pero no sobre la secuencia, se usan eslabones con marcadores másicos (o sea monómeros de PNA sustituidos en el esqueleto), caracterizados dentro de la biblioteca de PNA para cada posición aleatorizada. Como en esta forma el eslabón sintético de una base determinada tiene en la posición x una masa diferente que en la posición y, con igual composición bruta también pueden distinguirse las distintas secuencias a través de la masa molecular. Los respectivos sustituyentes se eligen por cálculo numérico, de modo que a cada secuencia imaginable le corresponda una masa establecida en virtud del tipo de síntesis de biblioteca descrito.

La síntesis de bibliotecas de sondas de ácido nucleico se realiza en el sintetizador, colocando mezclas de distintos derivados de nucleósidos (generalmente fósforamiditas) en las posiciones por aleatorizar. Las bibliotecas resultantes también pueden utilizarse como sondas en el procedimiento arriba descrito. Para distinguir las diferentes secuencias dentro de la biblioteca hay que romper un determinado enlace, p.ej. en las uniones fosfodiéster situadas a un lado fijo de las posiciones aleatorizadas.

En otra forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, las sondas van por tanto provistas de, al menos, una modificación en una posición definida y alejada de los nucleótidos aleatorizados, que facilita una división de las mismas.

En una forma de ejecución especialmente preferida, esta modificación consiste en introducir un grupo fósforotioato y/o una base de ARN y/o un enlace fosfortriéster.

Si la sonda contiene tres posiciones aleatorizadas, se necesitan como mínimo dos de dichas roturas de enlace (figura 10). Entonces resultan tres fragmentos que contienen respectivamente una posición aleatorizada y por tanto, en virtud de la composición ya conocida, permiten deducir la base variable. La división en los enlaces descritos puede resultar incompleta, lo cual permite la inclusión de fragmentos mayores para asegurar la información de la secuencia o para concretar en caso de ambigüedad. La rotura específica de enlace en las posiciones aleatorizadas se lleva a cabo introduciendo grupos fósforotioato en dichos puntos, ya durante la síntesis de la biblioteca. Estos grupos pueden primero hidroxialquilarse con halogenuros de hidroxialquilo y después dividirse selectivamente en condiciones básicas. Como alternativa se pueden preparar muestras que incorporen uracil junto a una posición aleatorizada. Mediante la uracil-ADN glucosilasa y un tratamiento alcalino posterior puede romperse el esqueleto en este punto.

La matriz suele elegirse de manera que presente un alto coeficiente de extinción a la longitud de onda seleccionada y favorezca la formación de cargas. En otra forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, la matriz, que favorece la desorción de las sondas por irradiación láser, consta de una solución de ácido á-ciano-4-hidroxicinámico en acetona en proporción 1:9 hasta 9:1, preferentemente en proporción 1:1, o de una mezcla de á-ciano-4-hidroxicinamato de metilo y ácido á-ciano-4-metoxicinámico o sinápico o sus derivados metílicos en proporción 1:9 hasta 9:1, preferentemente

en proporción 1:1.

En otra forma de ejecución preferida del procedimiento de la presente invención, la matriz consta de ácido α -ciano-4-hidroxycinámico o de una mezcla de α -ciano-4-hidroxycinamato de metilo y ácido α -ciano-4-metoxycinámico o α -ciano-4-hidroxycinámico o sinápico o sus derivados metílicos en proporción 1:99 hasta 99:1, preferentemente en proporción 1:1, que se aplica al soporte de muestras MALDI como solución en acetona, isopropanol, acetonitrilo, etanol, metanol o agua, o en una mezcla de dos o más de estos disolventes.

El principio del marcaje másico, arriba descrito para determinados eslabones en posiciones establecidas, puede ser utilizado para diversas bibliotecas parciales, que a su vez pueden reunirse en una biblioteca mayor.

Por tanto, en otra forma de ejecución preferida se preparan las sondas como bibliotecas parciales, dotadas de distintos marcadores de masa y/o carga. Para poder referir una masa analizada a una determinada biblioteca parcial, estas bibliotecas parciales también deben marcarse másicamente al sintetizarlas, lo cual se realiza de modo apropiado mediante aminoácidos naturales que, en una síntesis de fase sólida, se unen fácilmente a la biblioteca de PNA. Con el marcaje másico de distintas bibliotecas parciales puede ampliarse considerablemente el intervalo de masas disponible para el análisis de toda la biblioteca.

Asimismo, la presente invención se refiere a un equipo que contiene sondas y/o un soporte de muestras, eventualmente con las moléculas de ácido nucleico fijadas. El soporte de las muestras lleva un tratamiento superficial, tal como se ha expuesto anteriormente, permitiendo así la fijación de los ácidos nucleicos. El pretratamiento tiene lugar preferiblemente por vía química.

Las figuras representan:

Figura 1

Esquema de la impresión dactilar con exploración espectrométrica de masas.

1) Biblioteca preparada combinatoriamente de sondas distinguibles por la masa. 2) La biblioteca se hibrida a un ADN-objeto inmovilizado sobre una placa MALDI. Solo las sondas con secuencias complementarias a las del ADN-objeto se fijan a él. Tras un lavado intenso se aplica una matriz MALDI. 3) Mediante un analizador de masas se identifican las sondas hibridadas.

Figura 2

Representación esquemática del recubrimiento de una placa MALDI e inmovilización de una serie de ADN-objeto. Si la inmovilización no es covalente, se suelta el ligador bifuncional.

Figura 3

Marcadores de masa/carga en N terminales.

En el extremo 5' de un ácido nucleico o de una versión modificada de un ácido nucleico o en el extremo N terminal de un PNA puede introducirse un marcador cargado. Éste contiene un grupo N-hidroxi-succinimidoéster y un grupo amonio cuaternario. Ambas funcionalizaciones están separadas por un grupo R_1 que sirve para variar la masa de los marcadores cargados (el acoplamiento de los marcadores cargados se realiza a pH ligeramente básico (8,5) en solución acuosa sobre hielo. La reacción se completa en 30 minutos).

Figura 4

Mezcla 1:1 de PNA no modificado y PNA con marcador cargado.

Se ha analizado con una matriz de α -ciano-4-hidroxycinamato de metilo un PNA con marcador cargado y uno sin modificar en mezcla 1:1. Es evidente la distinta sensibilidad. La secuencia incompleta (1983 Da), acortada en una base y con marcador cargado, da una señal mucho más fuerte que la secuencia no modificada (2074 Da).

Figura 5

Distribución de masas en una biblioteca de PNA de 10 monómeros.

- 5 Dos posiciones de la secuencia están sintetizadas con bases degeneradas (TCGA). La secuencia es NTTGTTTTTCN. De ahí resultan 9 PNAs de distinta masa. En la biblioteca de PNA, CC = 2810 Da, CT = TC = 2825 Da, CA = AC = 2834 Da, TT = 2840 Da, TA = AT = 2849 Da no distinguible de CG = GC = 2850 Da, AA = 2858 Da, TG = GT = 2865 Da, AG = GA = 2874 Da y GG = 2890 Da. En general se observa separación de isotópica. La biblioteca completa de PNA va provista de un marcador
10 cargado, a través de una sola etapa de reacción. El análisis MALDI se realizó en una matriz formada por una mezcla 1:1 de ácido α -ciano-4-metoxicinámico y α -ciano-4-hidroxicinamato de metilo.

Figura 6

- 15 Marcaje másico/con carga

Una biblioteca de PNA de 10 monómeros, con 2 posiciones degeneradas por síntesis, se ha dotado de un marcador másico/cargado. La secuencia es NTTGTTTTTCN. Se muestra una mezcla de material de partida y biblioteca de PNA marcada en una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Es evidente la
20 ventaja de introducir un marcador de carga fija a la biblioteca. Las señales de la biblioteca con marcador cargado son detectables a igual concentración, mientras que los PNAs sin modificar no pueden detectarse. Es reconocible la secuencia incompleta acortada en una base.

Figura 7

- 25 Principio de la síntesis de bibliotecas de PNA empleando síntesis con marcador másico, efectuadas en paralelo, y eslabones L(posición aleatorizada) con marcador másico. En las posiciones aleatorizadas se utilizan distintas bases con unos sustituyentes también distintos en el esqueleto de PNA (como marcadores másicos). La masa de la correspondiente molécula de PNA está asignada claramente a su secuencia.

Figura 8

Espectro de masas MALDI calculado para una biblioteca de PNA.

- 35 Dos distintas síntesis en fase sólida (una de ellas con marcador másico), con 32 secuencias diferentes cada una, dan 64 picos másicos distintos, cada uno de los cuales está asignado a una secuencia específica de una biblioteca de PNA con 3 posiciones variables de 4 bases (A, C, G y T respectivamente). El cálculo se basa en los sustituyentes relacionados en la tabla 1 y se ha realizado con el programa informático MASP (© Dr. Christoph Steinbeck).

Figura 9

- Posibles eslabones de síntesis de PNA para la síntesis combinatoria en fase sólida Boc, usados también para sintetizar bibliotecas de PNA de masas distinguibles. Están representados los eslabones con marca-
45 dor másico que figuran en la tabla 1.

Figura 10

Análisis secuencial de sondas mediante roturas de enlace específicas.

- 50 Las distintas secuencias de una biblioteca de sondas de ADN también pueden identificarse por espectrometría de masas mediante roturas específicas de enlace en las posiciones aleatorizadas (N = A, G, C o T). Durante la síntesis en fase sólida ya se introduce un grupo fósforotioato en estas posiciones, por donde el ADN puede dividirse específicamente (p.ej. con yodoetanol). Esto está representado esquemáticamente
55 sin considerar la naturaleza química exacta de los fragmentos. La masa de los fragmentos permite determinar claramente toda la secuencia, sin tener que efectuar la secuenciación completa, ya que la secuencia es conocida en su mayor parte. El sustituyente R₁ designa otra secuencia de ADN cualquiera, R₂ otra secuencia cualquiera o -H. R₃ representa -OH (fosfodiéster) o alquilo- (alquilfosfonato).

Figura 11

Mezcla de sondas de PNA con "marcador cargado" CCXCAGCC (X = A, G, C, T) hibridada a un

ES 2 173 670 T3

ADN-objeto inmovilizado sobre Eupergit, la secuencia complementaria es CCCCAGCC. El espectro de abajo muestra la mezcla de partida, y el espectro de arriba una hibridación claramente preferida de la secuencia complementaria CCCCAGCC.

5 Figura 12

CCTCAGCC con "marcador cargado", complementario del ADN-objeto inmovilizado sobre el soporte de muestras MALDI y detectado tras incorporar la matriz de ácido 4-hidroxi- α -ciano-cinámico, sin movimiento del soporte de muestras durante la medición.

10

Los ejemplos aclaran la presente invención.

Ejemplo 1

15 *Exposición de todo el procedimiento de la presente invención*

Se recubre una placa MALDI con un sustrato que permite la inmovilización de un producto de PCR modificado químicamente (p.ej. una superficie funcionalizada con NH_2). A dicha superficie se transfiere y se fija una serie de ADN-objeto. La serie se hibrida con una biblioteca de sondas, preparada del modo descrito. Los componentes complementarios de la biblioteca de sondas se unen a los respectivos ADN-objeto. A continuación se lava a fondo para eliminar las sondas no unidas. Se aplica la matriz y la placa MALDI se coloca en el espectrómetro de masas. Con el láser se explora cada punto donde se encuentra un ADN-objeto y se realiza un análisis másico de las sondas unidas a estos ADN-objeto.

25 Ejemplo 2

Análisis de una biblioteca de PNA provista de marcadores cargados

Una biblioteca de PNAs se dota de marcadores cargados en una síntesis como la descrita aquí. La biblioteca de PNAs se disuelve y diluye en acetonitrilo al 50 %. La matriz MALDI (en este caso una mezcla 1:1 de ácido α -ciano-4-metoxicinámico y α -ciano-4-hidroxycinamato de metilo en acetona) se añade a la placa MALDI. El disolvente se evapora enseguida. Después se agregan 0,5 ml de la solución CT-PNA a la matriz seca. Tras la evaporación de este disolvente se traslada la placa MALDI al espectrómetro de masas y se analiza la sonda. El resultado se muestra en la figura 5.

35

Ejemplo 3

Análisis de una serie de ADN-objeto mediante CT-PNAs

Una biblioteca de CT-PNAs preparada combinatoriamente de la manera descrita se hibrida a una serie de ADN-objeto, inmovilizada sobre una placa MALDI. Las sondas que encuentran una secuencia complementaria en un ADN-objeto quedan unidas. Luego se lava la placa MALDI para eliminar todos los componentes sobrantes de la biblioteca. Se añade la matriz sobre la placa MALDI y ésta se traslada al espectrómetro de masas para su análisis (figura 1). Un ADN-objeto desconocido se caracteriza mediante las sondas hibridadas. Las analogías entre distintos ADN-objeto se destacan porque se unen a ellos las mismas sondas.

45

Ejemplo 4

50 *Análisis de una serie de ADN-objeto mediante sondas*

Las sondas se preparan individualmente y luego se reúnen en una biblioteca. Es esencial que ninguna masa quede cubierta por dos sondas distintas. Esta biblioteca de sondas se usa para hibridarla a una serie inmovilizada de ADN-objeto. Las sondas no fijadas se eliminan por lavado. Se aplica la matriz y las sondas unidas se analizan en el espectrómetro de masas.

55

Ejemplo 5

Preparación de bibliotecas parciales y análisis MALDI

60

La figura 8 y la tabla 1 muestran un ejemplo preferido de una biblioteca de PNA con una clara relación entre la masa y la secuencia. En un PNA cualquiera deben variarse tres posiciones en la síntesis

ES 2 173 670 T3

combinatoria de fase sólida. Para 4 bases distintas, ello corresponde a 64 posibles compuestos. En el presente ejemplo se realizan dos síntesis separadas con los eslabones indicados en la tabla 1. Además, la síntesis 2 se marca másicamente agregando dos unidades de valina. Cada síntesis parcial proporciona 32 compuestos distinguibles por su masa. Ambas bibliotecas parciales pueden reunirse luego en una biblioteca de 64 secuencias distintas con su correspondiente masa específica.

La figura 8 muestra el espectro de masas MALDI calculado para esta biblioteca. Los 64 picos no se solapan, cada uno corresponde a una secuencia específica de una biblioteca de PNA con tres posiciones aleatorizadas de bases (cada una con 4 bases).

Ejemplo 6

Tratamiento de la superficie del soporte de muestras MALDI

En una variante preferida del proceso, la superficie del soporte de muestras MALDI se recubre primero con silicato y a continuación se funcionaliza con epoxi-silano. Alternativamente también puede aplicarse un polímero acrílico funcionalizado con epoxi a la superficie metálica. El ADN-objeto se une covalentemente a la superficie mediante los grupos epoxi. En una variante especialmente preferida, el ADN a inmovilizar se dota primero de un grupo amino primario. Los grupos epoxi no reaccionados se desactivan seguidamente con un exceso de una amina y el proceso se continúa como en el ejemplo 4.

Ejemplo 7

Formación de una biblioteca con 448 sondas

Se realizan 7 síntesis según el método descrito en el último ejemplo y, a continuación, se acoplan los marcadores másicos/cargados.

	Campo másico
1.64 sondas: marcador cargado-TCP ₁ GAP ₂ GAP ₃ G	2600-2800 Da
2.64 sondas: marcador cargado+200 Da marcador másico-TCP ₁ AGP ₂ GAP ₃ G	2800-3000 Da
3.64 sondas: marcador cargado+400 Da marcador másico-TCP ₁ AGP ₂ AGP ₃ G	3000-3200 Da
4.64 sondas: marcador cargado+600 Da marcador másico-TCP ₁ AAP ₂ AGP ₃ G	3200-3400 Da
5.64 sondas: marcador cargado+800 Da marcador másico-TCP ₁ AAP ₂ GAP ₃ G	3400-3600 Da
6.64 sondas: marcador cargado+1000 Da marcador másico-TCP ₁ GAP ₂ GAP ₃ G	3600-3800 Da
7.64 sondas: marcador cargado+1200 Da marcador másico-TCP ₁ GAP ₂ AGP ₃ G	3800-4000 Da

En la serie sintética anterior, la sexta síntesis representa un control interno. Como alternativa también se puede realizar la siguiente síntesis:

6.64 sondas: marcador cargado+1000 Da marcador másico-TCP ₁ GGP ₂ GAP ₃ G	3600-3800 Da
--	--------------

Ejemplo 8

Inmovilización covalente de un ADN-objeto sobre una superficie metálica

1. Recubrimiento de la superficie metálica con silicato y silanos

Variante A

Se disuelven 50 mg de silicato sódico (Aldrich) en 600 μ l de agua agitando y calentando, y se mezcla gota a gota con 100 μ l de metanol. La solución no debe enturbiarse al cabo de 15 minutos de estar en reposo. Sobre la placa previamente limpiada se aplica una capa uniforme de esta solución con un paño suave y se deja secar a temperatura ambiente. La placa se sigue secando 15 minutos a 50°C y se lava en metanol. Luego se vuelve a calentar 15 minutos a 50°C y el silicato no polimerizado se elimina lavando con agua. La placa metálica "vitrificada" se trata 20 minutos con una solución de 3-(aminopropil)-triethoxisilano (al 2 % en acetona:agua/95:5), se lava con metanol y se seca a 50°C.

ES 2 173 670 T3

Variante B (preferida)

5 A la solución de silicato descrita en A) se le añade un 5 % de 3-(aminopropil)-triethoxisilano y con un paño suave se aplica una capa uniforme sobre la placa metálica. Tras secar a temperatura ambiente, la superficie se expone durante 30 s a los vapores de ácido clorhídrico concentrado, con lo cual adquiere una turbidez lechosa. La placa se seca 15 minutos a 50°C, se lava con metanol y agua, y luego se vuelve a secar.

Variante C

10 La placa previamente limpiada se silaniza durante 30 minutos en una disolución de 3-(aminopropil)-triethoxisilano (al 2 % en acetona:agua / 95:5). La placa se seca, se lava con metanol, se calienta 15 minutos a 50°C y se lava con agua.

Variante D

15 De manera análoga a las variantes A, B y C también es factible la funcionalización con tioles, usando 3-(mercaptopropil)-triethoxisilano

20 2. *Pretratamiento de un soporte metálico con epoxisilanos*

Se recubre con silicato un soporte metálico de muestras, tal como se ha descrito arriba. La superficie se lava varias veces con agua bidestilada. Una vez seco, el soporte de muestras se recubre con una mezcla 1:1 de 3-glicidiloxipropil-trimethoxisilano y trimethoxi[2-(7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-il)etil]silano (0,5 $\mu\text{l}/\text{mm}^2$) y se incuba durante 40 minutos sobre una placa calefactora. Las chapas se lavan a fondo con acetona, se secan 15 minutos a 55°C y se guardan al vacío.

3. *Funcionalización de ADN con un ligador*

30 Variante A

ADN sintetizado con un puente de fosforotioato se funcionaliza con exceso de SIAB (4-(yodoacetamido)-benzoato de N-hidroxisuccinimidilo, Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) en DMF. El disolvente se evapora al vacío y el residuo amarillento se lava varias veces con acetato de etilo y luego se seca. En estas condiciones reacciona exclusivamente el grupo yodoacetamido. El éster de N-hidroxisuccinimida permanece intacto para seguir reaccionando con grupos amino en el curso de la inmovilización.

Variante B

40 El oligonucleótido aminofuncionalizado se hace reaccionar a la temperatura ambiente con un exceso de SIAB en DMSO anhidro. El lavado se efectúa como en A). En estas condiciones, el SIAB reacciona en un 50 % con su grupo yodoacetamido y un 50 % con su grupo N-hidroxisuccinimidoéster. Entonces en cambio, la inmovilización puede tener lugar sobre una placa metálica tratada como en 1.D.

45 Variante C

Las variantes A) y B) también pueden efectuarse de modo análogo con ésteres NHS de ácidos halógenoalquilcarboxílicos. Sin embargo se requieren mayores tiempos de reacción y temperaturas más elevadas.

50

4. *Fijación de ADN a placas metálicas pretratadas*

Variante A

55 El ADN funcionalizado se disuelve en una solución saturada de acetato sódico en DMSO anhidro y se aplica sobre la placa metálica recubierta. A los 30 minutos de reacción se elimina el disolvente restante y la placa metálica se lava primero con disolución de cloruro amónico 1M y después con agua bidestilada, evitando una contaminación recíproca de los puntos contiguos. Se repite tres veces este proceso. Luego se enjuaga con mucha agua bidestilada y la placa metálica se conserva al vacío hasta la etapa siguiente

60

de hibridación.

Variante B

Análogamente a A) también es factible la inmovilización no covalente con ADN no modificado. En este caso se renuncia a la solución de cloruro amónico 1M en el proceso de lavado.

Variante C

La inmovilización de ADN-objeto sobre placas MALDI también puede realizarse como sigue. El ADN aminofuncionalizado (1,5 nmol) se diluye en un tampón de inmovilización (K_2HPO_4/KH_2PO_4 1M, pH 7,5). Las superficies funcionalizadas por silanización se recubren con esta solución y se dejan 16-20 h en reposo a temperatura ambiente. Las chapas se lavan a continuación varias veces con el tampón de hibridación y se secan.

Variante D

La inmovilización de ADN-objeto a una fase sólida epoxifuncionalizada puede efectuarse como sigue: se suspenden 10 mg de soporte (Eupergit C250 L, Röhm Pharma Polymere) en 1 ml de tampón de inmovilización (K_2HPO_4/KH_2PO_4 1M, pH 7,5). Se añade 1,5 nmol del ADN-objeto a inmovilizar y se incuba 24 h a la temperatura ambiente, agitando suavemente. Se retira el sobrante y los grupos epoxi no reaccionados se desactivan por tratamiento a temperatura ambiente durante 24 h con solución de glicina 1M. Se retira el sobrante y se lava varias veces el soporte. El ADN inmovilizado puede conservarse así a $-20^\circ C$ durante mucho tiempo.

5. Hibridación y preparación de muestras

La hibridación al ADN-objeto inmovilizado con sondas de PNA (o con sondas de ácido nucleico) tiene lugar en tampón SBS a la temperatura adecuada para cada sonda. La placa se enjuaga repetidamente, primero con tampón SBS y después con agua bidestilada. La placa metálica se seca al vacío y luego se recubre, separadamente en cada punto, con la matriz MALDI (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico al 1 % en acetona; o de modo análogo, el respectivo éster metílico para el procedimiento con PNAs/ácidos nucleicos "marcados con carga", o bien como variante preferida, una mezcla 1:1 del α -ciano-4-hidroxicinamato de metilo con ácido α -ciano-4-metoxicinámico para los PNAs "marcados con carga". Alternativamente, el recubrimiento también se puede efectuar con un pulverizador de matriz. Debido al rápido proceso de secado se evita la difusión dentro de la serie.

6. Variantes preferidas

En las variantes preferidas, la fijación de un ADN sintetizado con un puente de fósforotioato y funcionalizado con SIAB según 2.A tiene lugar en una superficie preparada sobre una placa metálica según 1.B, por reacción en DMSO anhidro a temperatura ambiente (30 minutos). Tras la hibridación con las sondas de PNA/ADN marcadas con carga, la placa MALDI se lava con agua bidestilada, se seca y se recubre en posición horizontal, separadamente para cada punto, con una mezcla de α -ciano-4-hidroxicinamato de metilo y ácido α -ciano-4-metoxicinámico (como en 5.).

7. Recubrimiento de proteína

Otra variante consiste en recubrir la superficie metálica de la placa MALDI con proteína. Para ello es apropiado el Gen32, una proteína que fija de forma secuencialmente específica ADN de cadena única. Después de recubrir la placa con esta proteína puede depositarse una serie de ADNs-objeto. Si la serie de los ADNs-objeto está formada por cADN, estos van cebados en la PCR con oligo-dT (p.ej. dTTT-TTTTTTTTTT). El oligo-dT interactúa fuertemente con el Gen32. El enlace covalente del oligo-dT al Gen32 puede lograrse mediante una fotorreticulación con luz UV corta.^{36,37} Tras esta inmovilización a la placa MALDI puede emplearse una biblioteca de sondas, de la manera descrita, para analizar la serie de ADNs-objeto. También se proponen interacciones de proteína/ADN secuencialmente específicas, como p.ej. GCN4/AP1.

Otra variante consiste en unir un ADN-objeto biotinizado a una perla magnética recubierta con estreptavidina. Este ADN-objeto se analiza con una biblioteca de sondas y, a continuación, las partículas magnéticas se trasladan a la placa MALDI, donde las sondas, por medio de la matriz y calentando ligeramente, se transfieren a la matriz.

TABLA 1

*Sustituyentes fijados a las subunidades de PNA para la preparación de una biblioteca marcada másicamente, con una clara relación masa/secuencia. *: Segunda síntesis, con 2 unidades de valina como marcador másico. Los correspondientes eslabones de síntesis están representados en la figura 9*

Base	Posición 1	Posición 2	Posición 3
A	H	iPr	H
T	H	Me	iPROCH ₂
C	H	H	iPROCH ₂ *
G	H	iBu	H*

Literatura

¹ Hoheisel, J.D. y Lehrach, H. 1993. Empleo de bibliotecas de referencia e impresión dactilar de hibridaciones para análisis genómico relacional. FEBS. 325: 118-122.

² Scholler, P., Karger, A.E., Meier-Ewert, S., Lehrach, H. y Hoheisel, J.D. 1995. Mapeo fino de bibliotecas de patrones de disparo rápido; una estrategia eficaz para la secuenciación sistemática de ADN genómico. Nucleic Acids Res. 23:3842-3849.

³ Brenner, S. 1994. Métodos de clasificación de polinucleótidos mediante el empleo de marcadores de oligonucleótidos. Patente US 5,604,097.

⁴ Brenner, S. 1995. Series de marcadores de oligonucleótidos con mínima hibridación cruzada. Patente US 5,635,400.

⁵ Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R. y Smith, L.M. 1994. Análisis directo por fluorescencia de polimorfismos genéticos por hibridación con series de oligonucleótidos en soportes de vidrio. Nucleic Acids Res. 22:5456-5465.

⁶ Church, G.M. y Kiefer-Higgins, S. 1988. Secuenciación múltiple de ADN. Ciencia. 240: 185-188

⁷ Church, G.M. y Kiefer-Higgins, S. 1990. Análisis múltiple de ADN. Patente US 5,149,625.

⁸ Arlinghaus, H.F., Kwoka, M.N., Guo, X.-Q. y Jacobson, K.B. 1997. Secuenciación múltiple de ADN y diagnóstico por hibridación con marcadores de isótopos estables enriquecidos. Anal. Chem. 69: 1510-1517.

⁹ Nielsen, P.E., Burchardt, O., Egholm, M. y Berg, R.H. 1993. Ácidos nucleicos peptídicos. Patente US 5,539,082.

¹⁰ Burchardt, O., Egholm, M., Berg, R.H. y Nielsen, P.E. 1993. Ácidos nucleicos peptídicos y sus aplicaciones potenciales en biotecnología, 11: 384-386.

¹¹ Karas, M. y Hillenkamp, F. 1988. Desorción ionización por láser de proteínas con masas moleculares superiores a 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301.

¹² Vestal, M.L., Juhasz, P. y Martín, S.A. 1995. Espectrometría de masas por tiempo de vuelo mediante desorción/ionización láser asistida por matriz de extracción retardada. Comunicación breve. Mass Spectrom. 9: 1044-1050.

¹³ Gut, I.G. y Beck, S. 1995. Espectrometría de masas láser de desorción ionización asistida por ADN y matriz. Biología molecular: innovaciones presentes y tendencias futuras. 1: 147-157.

¹⁴ Gut, I.G. y Beck, S. 1995. Procedimiento para alquilación selectiva de ADN y detección por espectro-

- metría de masas. *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-1373.
- ¹⁵ Gut, I.G. y Beck, S. 1995. Método para análisis de ácidos nucleicos. Patente WO96/27681.
- 5 ¹⁶ Gut, I.G., Jeffery, W.A., Pappin, D.J.C. y Beck, S. 1997. Análisis de ADN por espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz y "marcadores cargados". Comunicación breve. *Mass Spectrom.* 11: 43-50.
- ¹⁷ Butler, J.M., Jiang-Baucom, P., Huang, M., Belgrader, P. y Girard, J. 1996. Caracterización de ácidos
10 nucleicos peptídicos por espectrometría de masas MALDI-TOF. *Anal. Chem.* 68: 3283-3287.
- ¹⁸ Keough, T., Baker, T.R., Dobson, R.L.M., Lacey, M.P., Riley, T.A., Hasselfield, J.A. y Hesselberth, P.E. 1993. Oligonucleótidos de ADN antisentido II: empleo de espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz para verificar la secuencia de metilfosfonato oligodesoxirribonucleótidos. Comunicación breve. *Mass Spectrom.* 7: 195-200.
15
- ¹⁹ Ross, P.L., Lee, K. y Belgrader, P. 1997. Discriminación de polimorfismos de nucleótido simple en ADN humano mediante muestras de ácido nucleico peptídico detectadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. *Anal. Chem.* 69: 4197-4202.
- 20 ²⁰ Lowe, G. 1995. Química combinatoria. *Chem. Soc. Rev.* 24: 309.
- ²¹ Jung, G., Früchtel, J.S. 1996. Química orgánica en fase sólida. *Angew. Chem.* 108: 19-46.
- 25 ²² Choong, I.C., Ellman, J.A. 1996. Síntesis en fase sólida: aplicaciones a bibliotecas combinatorias. *Ann. Reports in Med. Chem.* 31: 309.
- ²³ Pirrung, M.C. 1997. Bibliotecas combinatorias dirigibles espacialmente. *Chem. Rev.* 97: 473.
- 30 ²⁴ Cook, P.D., Kiely, J. y Sprankle, K. 1994. Bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos peptídicos y métodos de síntesis perfeccionados. Patente US 5,539,083.
- ²⁵ Nielsen, P.E. Ácidos nucleicos peptídicos: una nueva dimensión para bibliotecas de péptidos y aptómeros. *Métodos de enzimología.* 426-433.
- 35 ²⁶ Metzger, J.W., Stevanovic, S., Brünjes, J., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. 1994. Espectrometría de masas por electropulverización y análisis secuencial múltiple de bibliotecas de péptidos sintéticos. *Métodos: manual de métodos de enzimología* 6: 425-431.
- 40 ²⁷ Loo, J.A., DeJohn, D.E., Andrews, P.C. 1996. Aplicación de la espectrometría de masas para caracterizar e identificar ligandos a partir de bibliotecas combinatorias. *Ann. Reports in Med. Chem.* 31:319.
- ²⁸ Pomerantz, S.C., McCloskey, J.A., Eaton, B.C., 1997. Despliegue de bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos por espectrometría de masas tandem mediante ionización por electropulverización. *J. Am. Chem. Soc.* 119:3861.
45
- ²⁹ Carr, S.A., Benkovic, S.J., Winograd, N. 1996. Evaluación de métodos de espectrometría de masas aplicables al análisis directo de bibliotecas combinatorias no peptídicas unidas a perlas. *Anal. Chem.* 68: 237.
- 50 ³⁰ Uhlen, M. y otros. 1988, *Nucleic Acids Res.* 16, 3025-3038.
- ³¹ Chrisey, L.A., Lee, G.U. y O'Ferrall, C.E. 1996. Fijación covalente de ADN sintético a filmes monocapa autoformados. *Nucleic Acids Res.* 24, 3031-3039.
- 55 ³² Timofeev, E.N., Kochetkova, S.V., Mirzabekov, A.D. y Florentiev, V.L. 1996. Inmovilización regional selectiva de oligonucleótidos cortos sobre geles de copolímeros acrílicos. *Nucleic Acids Res.* 24, 3142-3148.
- 60 ³³ O'Donnell, M.J., Tang, K., Köster, H., Smith, C.L. y Cantor, C.R. 1997. Fijación covalente altamente densa de ADN a obleas de silicona para análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. *Anal. Chem.* 69: 2438-2443.

ES 2 173 670 T3

³⁴ Cantor, C.R. 1995. Métodos para preparar una serie de muestras por hibridación. Patente US 5,631,134.

5 ³⁵ Bruick, R.K., Koppitz, M., Joyce, G.F. y Orgel, L.E. 1997. Procedimiento sencillo para construir oligodesoxinucleótidos con amino 5' terminal, en solución acuosa. Nucleic Acids Res. 25, 1309-1310.

³⁶ Hockensmith, J.W., Kubasek, W.L., Vorachek, W.R. y von Hippel, P.H. 1993. Reticulación láser de proteínas a ácidos nucleicos. J. Bio. Chem. 268: 15712-15720.

10 ³⁷ von Hippel, P.H. 1994. Reconomcimiento de proteína-ADN: nuevas perspectivas y temas fundamentales. Ciencia. 263: 769-770.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para identificar una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico, el cual comprende las siguientes etapas:
 - 5 (a) hibridación de moléculas de ácido nucleico con una serie de sondas de distintas secuencias de nucleobases, en que cada sonda posee una masa diferente de todas las demás;
 - (b) separación de las sondas no hibridadas;
 - 10 (c) puesta en contacto de las sondas hibridadas con una matriz que favorece la desorción de las sondas mediante un rayo láser;
 - (d) análisis de las sondas hibridadas y envueltas por la matriz, sobre un soporte de muestras formado por material eléctricamente conductor, en un espectrómetro de masas, y
 - 15 (e) determinación de las moléculas de ácido nucleico que presentan la secuencia, de modo que las posiciones de las sondas en el soporte de muestras permiten una asignación a la molécula de ácido nucleico con la cual se hibridan.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en que las moléculas de ácido nucleico se aplican sobre la superficie de un soporte, antes o después de la etapa (a).
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en que la superficie soporte es la del soporte de muestras, formado por material eléctricamente conductor.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 2, en que antes de la etapa (c), el soporte que lleva sobre su superficie las moléculas de ácido nucleico, con las sondas hibridadas, se aplica sobre el soporte formado por material conductor.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 2, en que antes, después, o por contacto con la matriz en la etapa (c), las sondas hibridadas se desprenden de las moléculas inmovilizadas de ácido nucleico y se aplican sobre el soporte de muestras formado por material eléctricamente conductor.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en que el soporte de muestras presenta una superficie metálica, una superficie recubierta de vidrio o una superficie modificada químicamente.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en que la hibridación de las moléculas de ácido nucleico a la superficie del soporte de muestras tiene lugar a través de un grupo NH_2 , epoxi o SH, recubriendo la superficie del soporte de muestras con un silicato o silano, mediante una interacción proteína-sustrato, proteína-proteína o proteína-ácido nucleico, o mediante una interacción de dos componentes hidrófobos.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en que la interacción proteína-sustrato es un enlace biotina-estreptavidina o un enlace anticuerpo-antígeno.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en que la interacción proteína-ácido nucleico es un enlace Gen32-ácido nucleico.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en que las sondas son ácidos nucleicos provistos de un marcador másico.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en que el marcador másico es al mismo tiempo un marcador cargado.
12. Procedimiento según la reivindicación 10, en que los ácidos nucleicos van provistos adicionalmente de un marcador cargado.
- 55 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en que las sondas son moléculas modificadas de ácidos nucleicos.
- 60 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en que las moléculas modificadas de ácidos nucleicos son PNAs, ácidos alquilfosforotioato-nucleicos o bien ácidos alquilfosfonato-nucleicos.

ES 2 173 670 T3

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, en que las sondas se preparan por síntesis combinatoria en fase sólida.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en que los distintos eslabones de bases se marcan de tal modo, que las sondas sintetizadas a partir de ellos se distinguen respectivamente por sus masas en el espectrómetro de masas.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en que el marcador es un grupo metilo, etilo, propilo, un grupo alquilo ramificado o lineal, un grupo alquilo, alcoxialquilo, alquilarilo, arilalquilo, alcoxiarilo o ariloxialquilo ramificado o lineal sustituido con halógeno, o alguna de sus variantes con deuterio u otros isótopos.

18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 17, en que las sondas van provistas de, al menos, una modificación en una posición definida y alejada de los nucleótidos aleatorizados, que facilita una división de las mismas.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en que la modificación consiste en introducir en la sonda un grupo fósforotioato y/o una base de ARN y/o un enlace fosforotriéster.

20. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, en que la matriz es una solución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetona en proporción 1:9 hasta 9:1, preferentemente en proporción 1:1, o de una mezcla de α -ciano-4-hidroxicinamato de metilo y ácido α -ciano-4-metoxicinámico o sinápico o sus derivados metílicos en proporción 1:9 hasta 9:1, preferentemente en proporción 1:1.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 19, en que la matriz es ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o bien una mezcla de α -ciano-4-hidroxicinamato de metilo y ácido α -ciano-4-metoxicinámico o α -ciano-4-hidroxicinámico o sinápico o sus derivados metílicos en proporción 1:99 hasta 99:1, preferentemente en proporción 1:1, que se aplica al soporte de muestras MALDI como solución en acetona, isopropanol, acetonitrilo, etanol, metanol o agua, o en una mezcla de dos o más de estos disolventes.

22. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 21, en que las sondas se preparan como bibliotecas parciales, dotadas de distintos marcadores de masa y/o carga.

23. Un equipo que contiene

(a) una serie de sondas, tal como está definida en una de las reivindicaciones 11 a 18 y/o

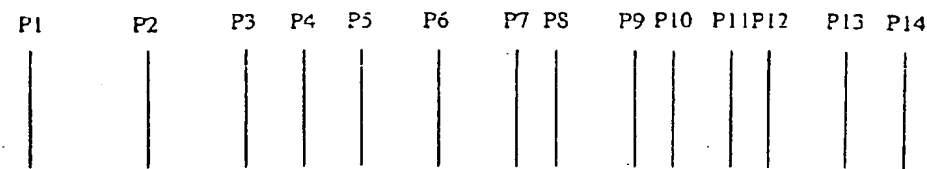
(b) un soporte de muestras que está pretratado, y que por tanto permite la fijación de una serie de ADNs-objeto y/o que ya lleva ADNs-objeto fijados.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

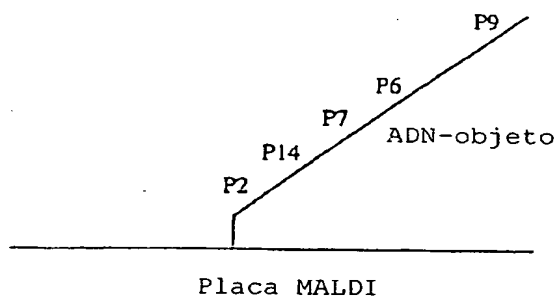
Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

ES 2 173 670 T3

1) Distribución másica de las muestras



2) Hibridación



3) Distribución másica de las muestras hibridadas

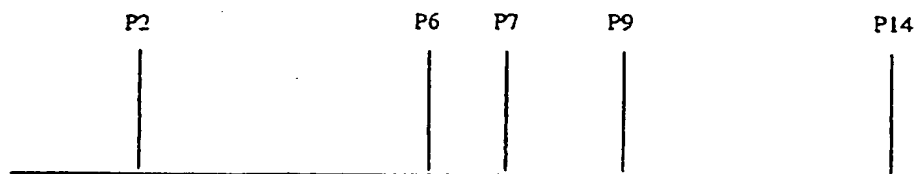


Fig. 1

Inmovilización de ADN directamente sobre la placa MALDI
(ejemplo)

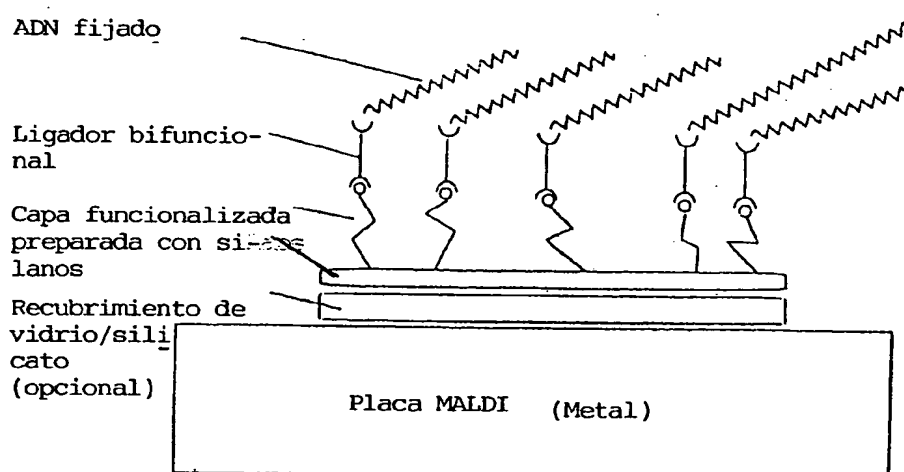
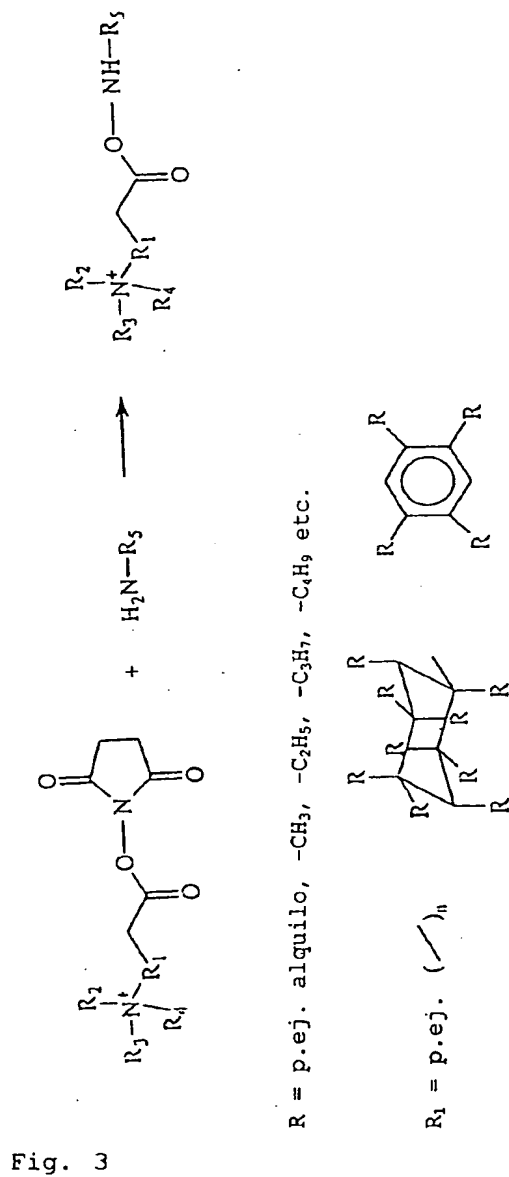
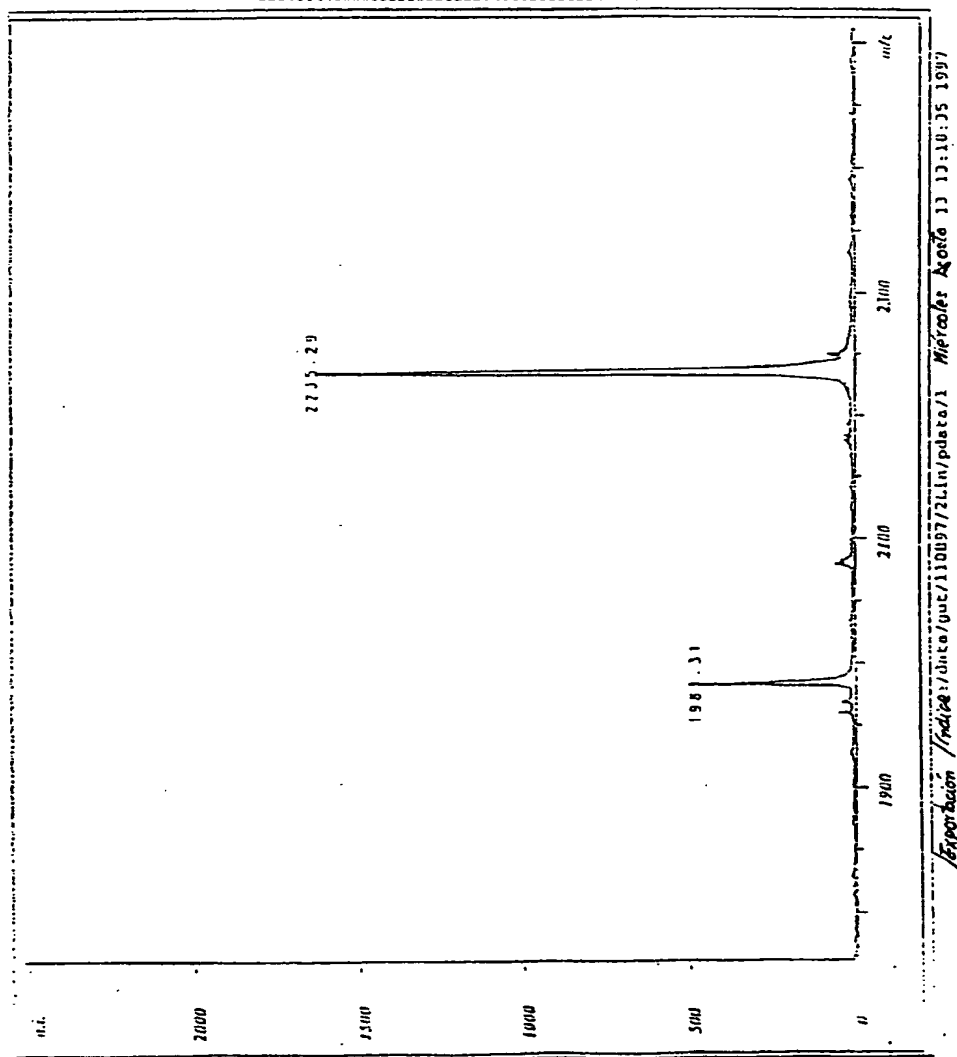


Fig. 2

Marcado másico/con carga en N terminal



[illegible]

23

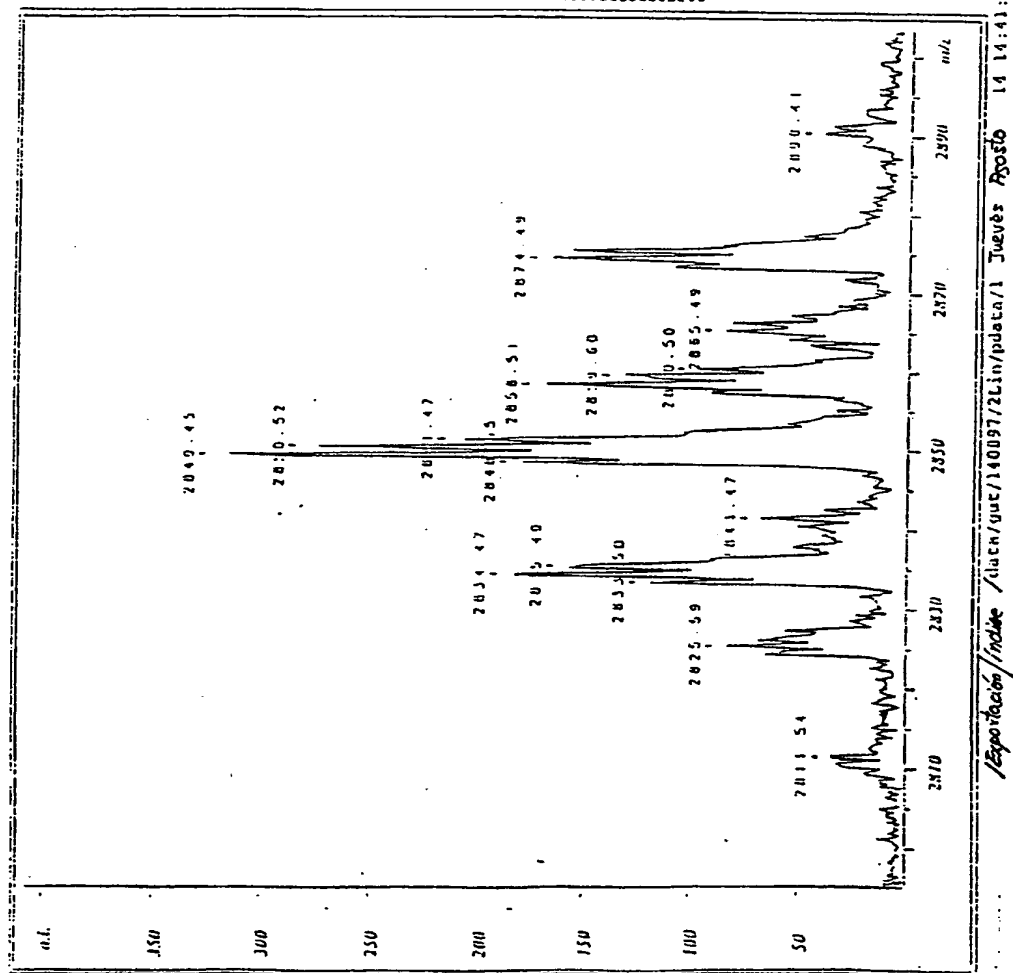
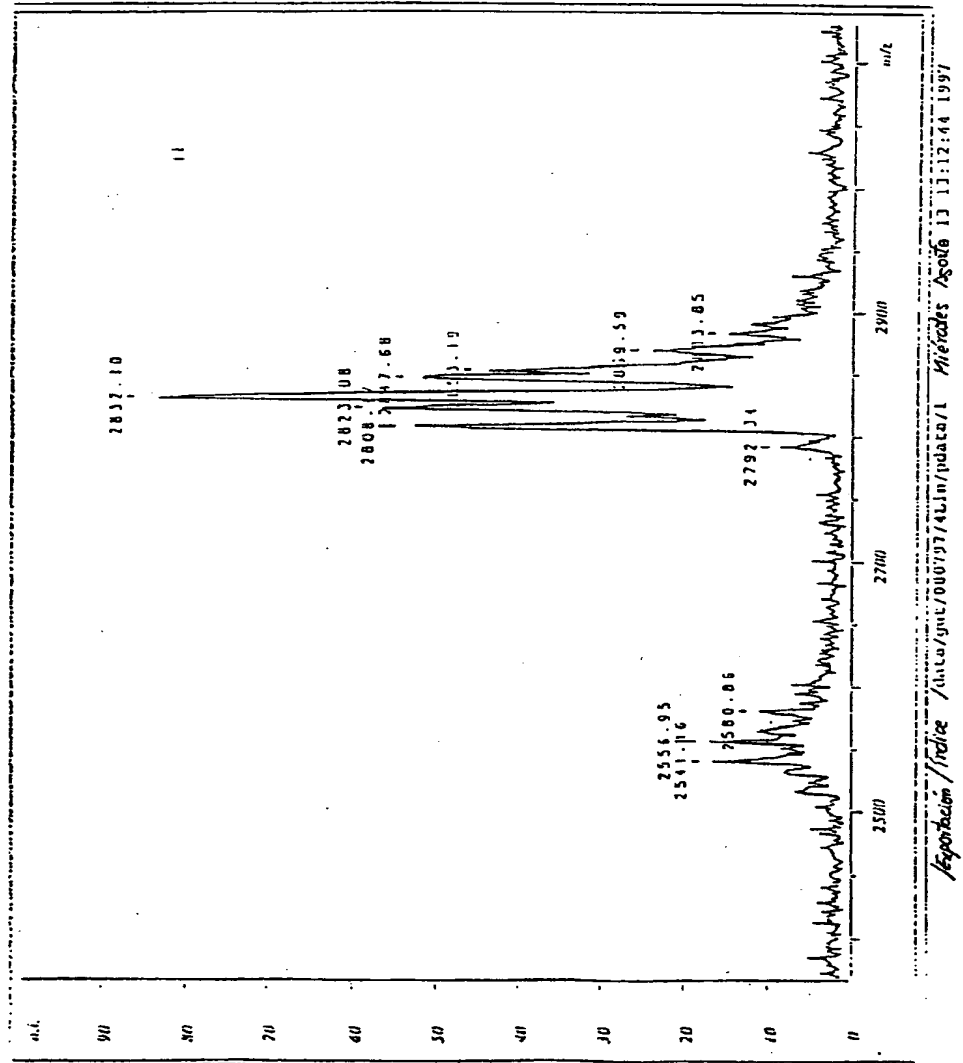
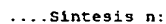
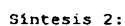


Fig. 5

[illegible]

25



L(n) son distintas series de sustituyentes, escogidas de manera específica para cada base, que se usan en cada etapa de síntesis, a fin de obtener el mínimo solapamiento de picos en la espectrometría de masas MALDI

26

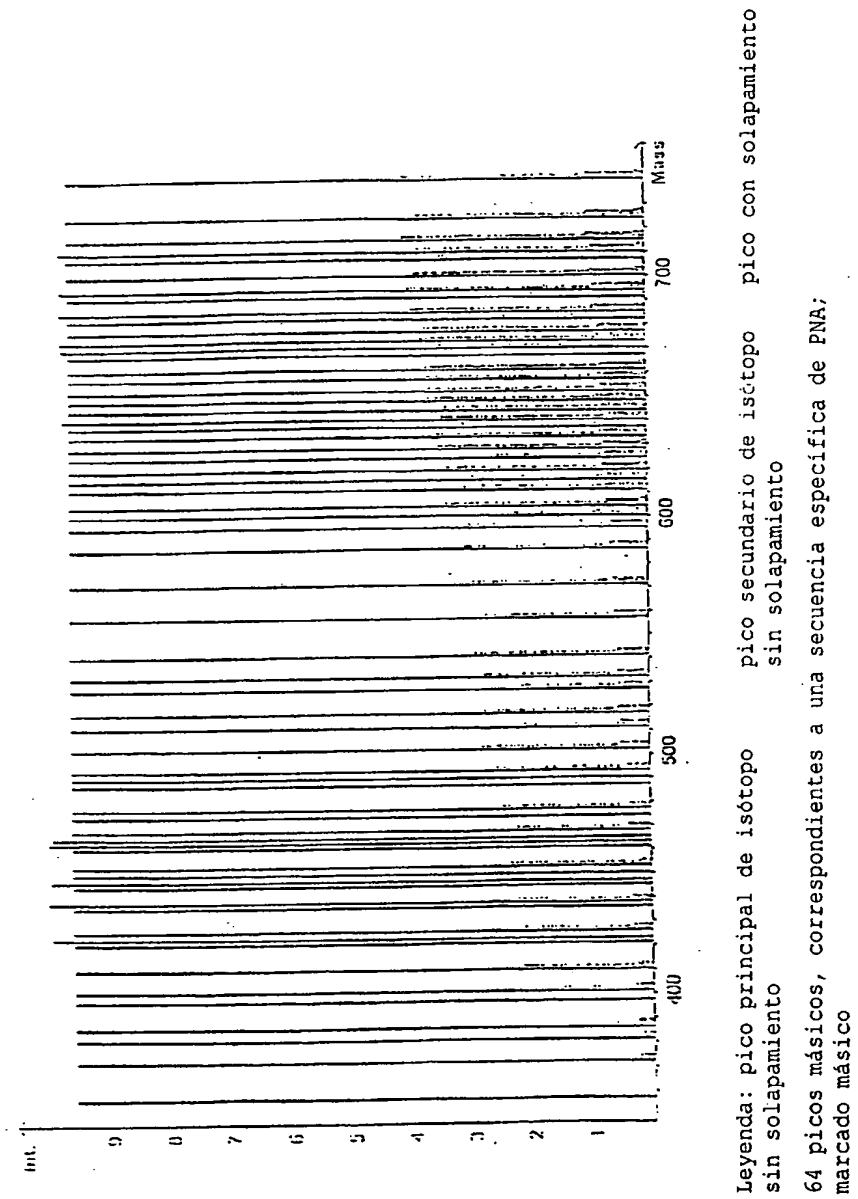


Fig. 8

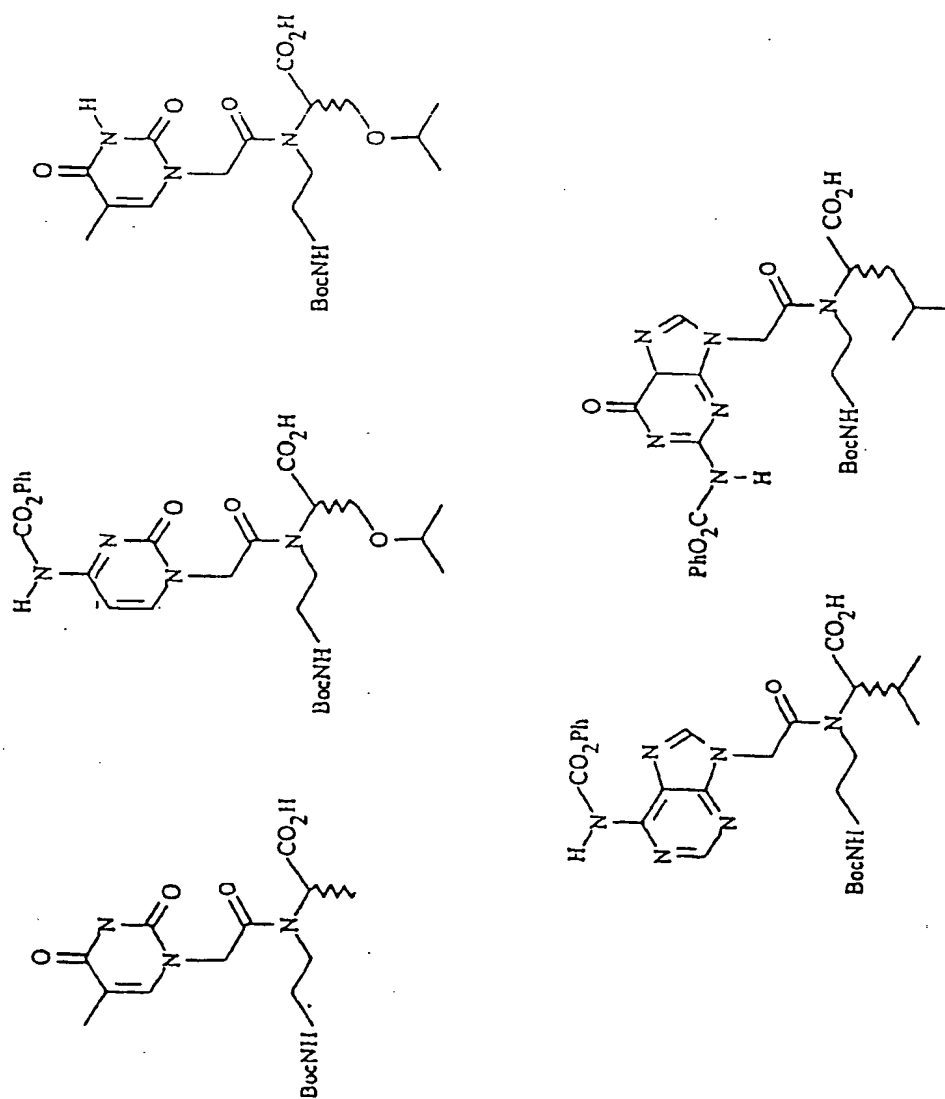


Fig. 9

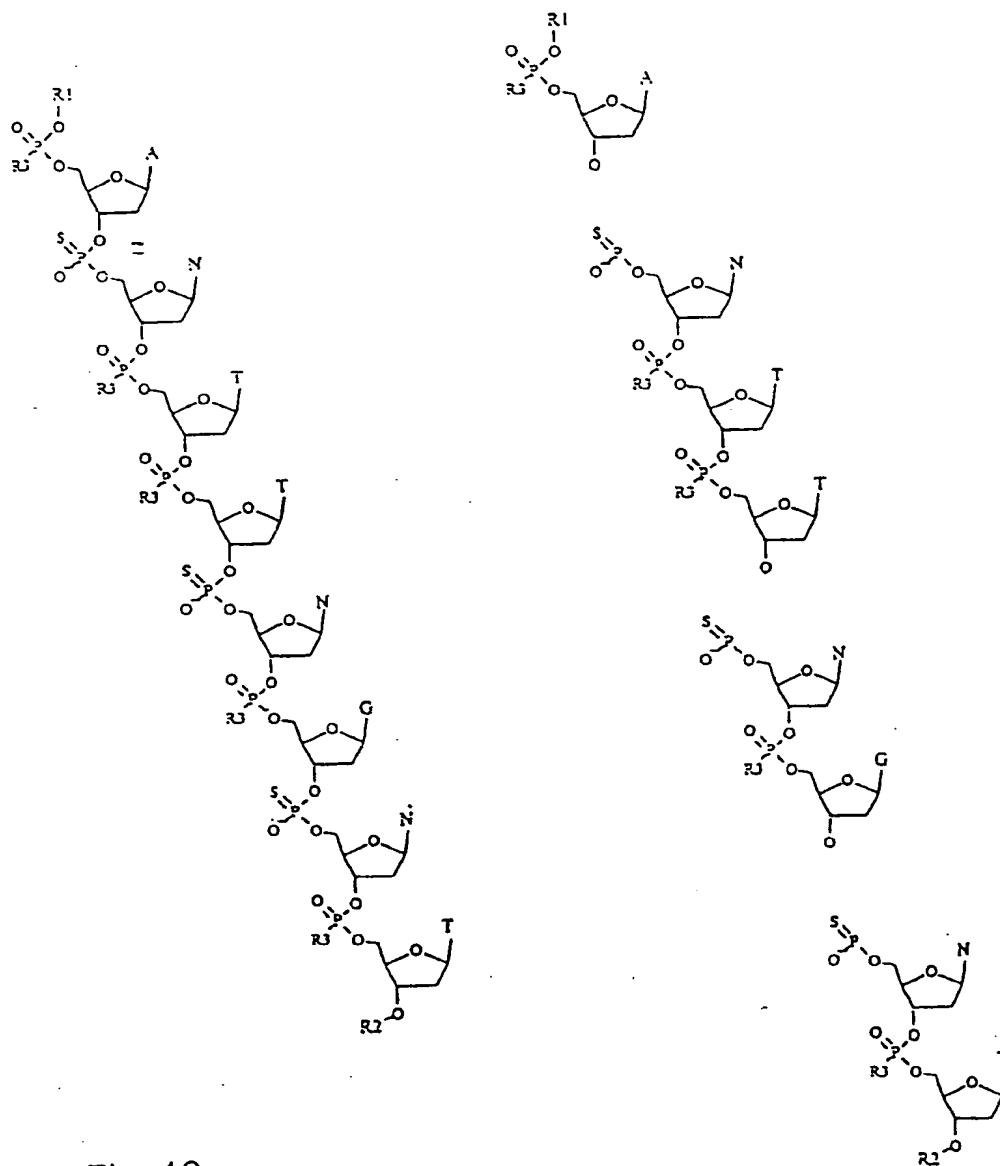
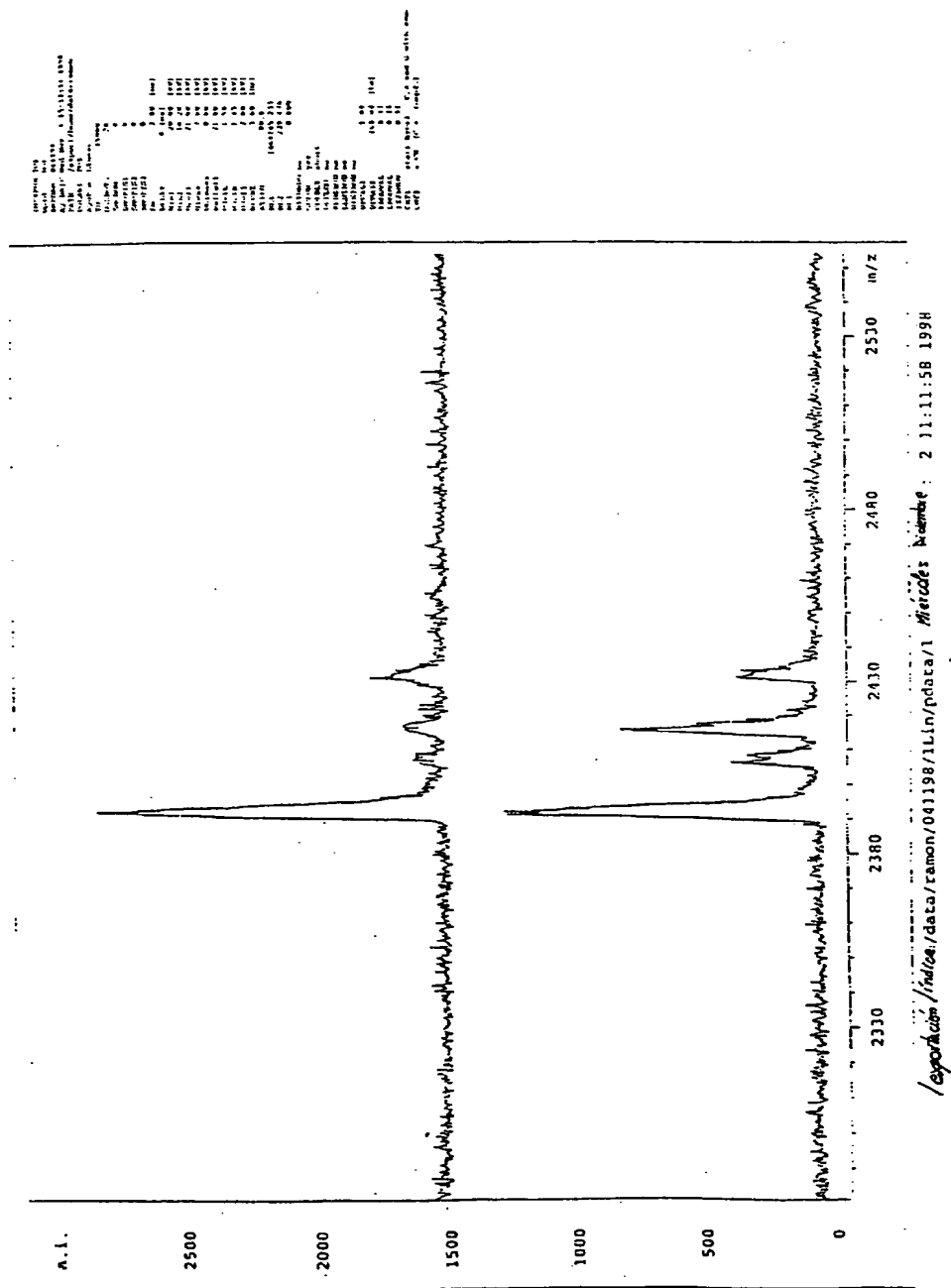


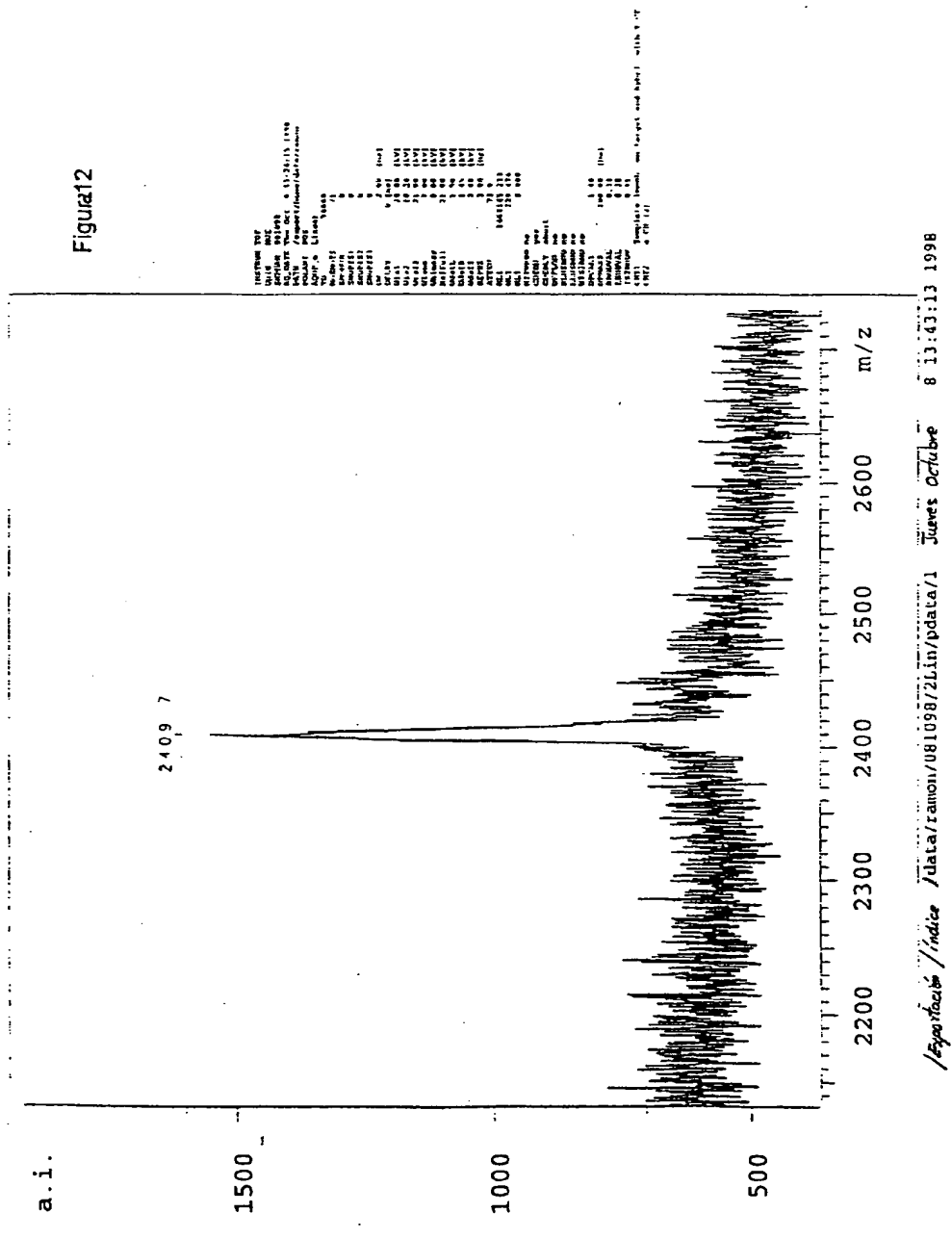
Fig. 10

Figura 11



ES 2 173 670 T3

Figura12



/Exportación/Indice /data/ramon/081098/2Lin/pdata/1 Jueves Octubre 8 13:43:13 1998

European
Patent Office

esp@cenet

[Home](#) | [Contact](#)[English](#) | [Deutsch](#) | [Français](#)[Quick Search](#)[Advanced Search](#)[Number Search](#)[Last Results list](#)[My patents list](#) 0[Classification Search](#)[Help](#)**Quick Help**

- » Why are some tabs grey for certain documents?
- » Why does a list of documents with the title Also published as appear sometimes and what are these documents? ▲ top
- » What does A1, A2, A3 and B mean after an EP publication number, which appears sometimes under the Also published as list?
- » What is a cited document?
- » Why do I not always see cited documents?
- » Why do I sometimes see the abstract of a correspondent document?
- » What is a mosaic?

[In my patents list](#) | [Print](#)[Return to family list](#) | [Previous in family list](#) 6/8 [Next in family list](#)**METHOD FOR IDENTIFYING NUCLEIC ACIDS BY MEANS OF MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONISATION MASS SPECTROMETRY****Bibliographic data****Description****Claims****Mosaics****Original document****INPADOC LEGAL status****Patent number:** ES2173670T**Publication date:** 2002-10-16**Inventor:** BERLIN KURT (DE); LEHRACH HANS (DE); GUT IVO GLYNNE (FR)**Applicant:** MAX PLANCK GESELLSCHAFT**Classification:****- international:** C12Q1/68**- european:****Application number:** ES19980966608T 19981204**Priority number(s):** EP19970121471 19971205**Also published as:**

WO9929898 (A3)

WO9929898 (A2)

View INPADOC patent family

Abstract not available for ES2173670T

Abstract of correspondent: WO9929898

The present invention relates to a method for detecting a nucleotide sequence in a nucleic acid molecule by means of predetermined probes of varying mass using matrix-assisted spectrometry. One advantage of the inventive method is that it provides for simultaneous characterization of a plurality of unknown nucleic acid molecules by a salt from various probes. The invention also relates to a kit containing the probes and/or a sample carrier, optionally with nucleic acids bonded thereto.